

действовал на субтилизин Карлсберг. В результате ПЦР из генома картофеля был выделен амплифицированный фрагмент ДНК, обозначенный как *PKPIJ-B*, состоящий по данным секвенирования из 582 пар нуклеотидов. На основании нуклеотидной последовательности (н.п.) выделенного фрагмента гена *PKPIJ-B* была восстановлена аминокислотная последовательность кодируемого им белка. Последовательность первых 20 остатков полностью совпадала с определенной ранее N-концевой аминокислотной последовательностью белка PKCI-23. Сравнение полученной н.п. с опубликованными в NCBI последовательностями, кодирующими белки группы PKPI-B из других шести сортов картофеля, показало высокую степень гомологии (от 89 до 99 % идентичных остатков) между ними. Замены во всех последовательностях локализуются в одних и тех же участках. Это может указывать на то, что они являются точками рекомбинации. Анализ аминокислотных последовательностей PKCI-23 и известных белков PKPI-B, показал, что они содержат от 86,5 до 98,6 % идентичных остатков, часть из которых является консервативной. К ним в первую очередь относятся первые 10 и остатки цистина. Несмотря на высокое сходство первичных структур, белки PKPI-B различаются по специфичности действия на химотрипсин и трипсин, что связано с заменами аминокислот в реактивных центрах, ответственных за связывание ферментов. Можно предположить, что эти замены происходят в результате адаптивной эволюции, направленной на защиту растений от фитопатогенных микроорганизмов и насекомых-вредителей.

Библиографический список

1. Bauw, G., Nielsen, H.V., Emmersen, J., Nielsen, K.L., Jorgensen, M., Welinder, K.G. // Patatins, Kunitz protease inhibitors and other major proteins in tuber of potato cv. Kuras. FEBS Journal. 2006. № 273. P. 3569-3584.
2. Heibges A., Glaczinski H., Ballvora A., Salamini F., Gebhardt C. // Structural diversity and organization of three gene families for Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.).// Mol Gen Genomics 2003. № 269. P. 526–534.
3. Ishikaw, A., Ohta S., Matsuoka K., Hattori, T., Nakamura K. // A Family of Potato Genes That Encode Kunitz-Type Proteinase Inhibitors: Structural Comparisons and Differential Expression. Plant and Cell Physiology. 1994. Vol. 35. № 2. P. 303-312.

***bph*-ГЕНЫ ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ БАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS*, КОНТРОЛИРУЮЩИЕ ПЕРВЫЙ ЭТАП ОКИСЛЕНИЯ БИФЕНИЛА**

И.О. Коршунова¹, Д.О. Егорова²

¹ Пермский государственный университет, Пермь

² Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермь, e-mail: daryao@rambler.ru

С 70-х годов XX века особое внимание уделяется проблеме утилизации полихлорированных бифенилов (ПХБ) – токсичных, химически стойких

соединений, представляющих угрозу для живых организмов. Показано, что наиболее эффективным и экономически выгодным является разложение ПХБ с использованием бактерий (Васильева, Стрижакова, 2007). Активность штаммов по отношению к ПХБ обуславливается наличием метаболических систем разложения незамещенного бифенила (Pieper, 2005). При аэробной деструкции бифенил разлагается до бензойной и гидроксипентадиеновой кислоты благодаря последовательному действию ферментов бифенил диоксигеназы, дигидродиол дегидрогеназы, 2,3-дигидроксибифенил диоксигеназы и гидролазы. Эти ферменты, кодируемые *bph*-генами, обычно индуцируются бифенилом и вовлечены в кометаболизм ПХБ. Основным ферментом, определяющим деструктивную активность бактериальных штаммов, является бифенил диоксигеназа (гены *bphA1A2A3A4*) (Pieper, 2005). Особый интерес представляет изучение систем биodeградации бифенила у бактерий, способных разлагать данные поллютанты в экстремальных условиях, в частности при повышенной солености среды.

Цель – изучить гены, кодирующие α -субъединицу подсемейства бифенил/толуол диоксигеназ, галотолерантных бактерий-деструкторов бифенила рода *Rhodococcus*.

Скрининг галотолерантных штаммов *Rhodococcus* sp. ЕК-7, ЕК-8, ЕК-9, ЕК-10, ЕК-11 и ЕК-12 показал наличие одного из главных генов деструкции бифенила – гена *bphA1*. Длина ДНК-фрагментов составляет порядка 500 п.н. Амплифицированные участки ДНК соответствуют правой части генов α -субъединиц терминальных оксигеназ, включающих каталитический центр (Witzig *et al.*, 2006).

Для выявления сходства и различий между исследуемыми участками генов, кодирующих α -субъединицу подсемейства бифенил/толуол диоксигеназ, был проведен анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ) полученных ампликонов. Гидролиз ДНК эндонуклеазой *HhaI* привел к образованию фрагментов длиной 250, 127 и 55 п.н. Набор рестрикционных фрагментов полученный после обработки ампликонов *bphA1*-гена исследуемых штаммов рестриктазой *HaeIII* был представлен фрагментами ДНК длиной 130, 115, 90 и 77 п.н. Таким образом, ПДРФ-анализ выявил сходство между исследуемыми участками *bphA1*-гена штаммов *Rhodococcus* sp. ЕК-7, ЕК-8, ЕК-9, ЕК-10, ЕК-11 и ЕК-12, а так же известных штаммов-деструкторов бифенила рода *Rhodococcus*.

Определены нуклеотидные последовательности фрагментов генов α -субъединицы подсемейства бифенил/толуол диоксигеназ размером 395-415 п.н., амплифицированные с ДНК штаммов *Rhodococcus* sp. ЕК-7, ЕК-10 и ЕК-11. Исследуемые участки ДНК были на 95–99 % сходны с генами α -субъединиц бифенил-, бензол-, толуол диоксигеназ бактерий рода *Rhodococcus*. Наибольшее сходство (99 %) наблюдалось с геном *bphA1* деструктора ПХБ *Rhodococcus* sp. P1. Сходство с геном *bphA1* известного активного штамма-деструктора ПХБ *Rhodococcus jostii* RHA1 составило 95 %.

Работа поддержана Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

Библиографический список

1. *Васильева Г.К., Стрижакова Е.Р.* Биоремедиация почв и седиментов, загрязненных полихлорированными бифенилами // Микробиология. 2007. Т. 76, №6. С. 725-741.
2. *Pieper D.H.* Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls // Applied Microbiology and Biotechnology. 2005. V. 67. P. 170-191.
3. *Witzig R., Junca H., Hecht H.-J., Pieper D. H.* Assessment of toluene/biphenyl dioxygenase gene diversity in benzene-polluted soils: links between benzene biodegradation and genes similar in those encoding isopropylbenzene dioxygenases // Applied and Environmental Microbiology. 2006. V. 72, №5. P. 3504-3514.